

Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño

Using different disinfection treatments on *in vitro* cultures of the “caraqueño” *Dioscorea alata* L. clone

Misterbino Borges García¹, Edil Estrada Abeal¹,
Idelisa Pérez Rodríguez¹ y Silvio Meneses Rodríguez¹

Resumen

El cultivo *in vitro*, como técnica, consiste en cultivar asepticamente una porción aislada de la planta bajo condiciones de ambiente controlado, para que las células expresen su potencial intrínseco e inducido. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de diferentes concentraciones y tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio en el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de ñame (*Dioscorea alata* L.) clon caraqueño. Las variantes de desinfección consistieron en la utilización de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (1,5; 2 y 2,5%) durante distintos tiempos de inmersión (10; 20 y 30 min). A los 7 días se evaluó el porcentaje de contaminación de bacterias y hongos respectivamente, y a los 40 días el número de nudos de novo, la longitud del vástago, el número de hojas, y el porcentaje de explantes establecidos y necrosados. Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado con análisis de varianza bifactorial y clasificación simple. Se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey para un nivel de significación del 5%. Los resultados obtenidos arrojaron que el tratamiento de desinfección de segmentos uninodales de ñame con hipoclorito de sodio al 1,5% durante un tiempo de inmersión 30 min es el de mayor efectividad para el establecimiento *in vitro* de explantes primarios del ñame (*D. alata* L.) clon caraqueño con altos porcentajes de supervivencia en condiciones *ex vitro*.

Palabras clave: ñame, cultivo de tejidos vegetales, hipoclorito de sodio, establecimiento *in vitro*.

Abstract

The *in vitro* culture technique consists of aseptically culturing an isolated plant portion in controlled environmental conditions for the cells to express their intrinsic and induced potential. This work was aimed at determining the effect of different sodium hypochlorite concentrations and immersion times on *in vitro* establishment of yam (*Dioscorea alata* L.) “caraqueño” clone primary explants. Disinfection varied by using different sodium hypochlorite concentrations (1.5%, 2% and 2.5%) during different immersion times (10, 20 and 30 min). Bacterial and fungal contamination percentages were evaluated after 7 days and de novo bud

¹ Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Bayamo 85 100 Granma. Cuba. mborges@ude.co.cu

number, shoot length, leaf number, explant establishment and necrosis percentages were determined after 40 days. A totally randomised experimental design was applied, having one- and two-factor variance analysis; the Tukey test was used for comparing means at 5% significance level. The results showed that the most appropriate disinfection treatment for uninodal yam (*D. alata* L.) segments used 1.5% sodium hypochlorite during 30 min immersion; this was most effective for the *in vitro* establishment of yam (*D. alata* L.) clone "caraqueño" primary explants, having high survival percentage in *ex vitro* conditions.

Key words: yam, plant tissue culture, sodium hypochlorite, *in vitro* establishment.

Recibido: junio 10 de 2009

Aprobado: noviembre 3 de 2009

Introducción

El ñame pertenece a la familia *Dioscoreaceae* que comprende más de 600 especies distribuidas en la zona intertropical húmeda. *Dioscorea alata* L. es una especie originaria de Asia que ha sido cultivada desde hace miles de años. Está compuesta por plantas trepadoras que producen tubérculos profundos de gran tamaño con alto contenido de almidón. Se reproduce principalmente de forma vegetativa mediante fracciones de los tubérculos, lo que constituye la principal causa de la poca disponibilidad de material de siembra, ya que alrededor del 30% de los mismos son guardados con este fin. Adicionalmente, a consecuencia de la reproducción vegetativa, las enfermedades son transferidas de un ciclo a otro y de una localidad a otra, incidiendo esto sobre la productividad del cultivo (Rodríguez *et al.*, 2008).

En Cuba, los rendimientos alcanzados para el cultivo del ñame no difieren de los promedios mundiales, sin embargo, en los últimos años se ha producido una tendencia a la disminución de la producción debido a que el género ha sido sometido a un alto riesgo de erosión genética a causa de diversos factores bióticos y abióticos, lo que ha ocasionado una drástica reducción del área cultivada, y genotipos valiosos han quedado confinados a regiones montañosas intrincadas (Borges *et al.*, 2003). Casi la totalidad de la producción se deriva de agricultores individuales, mientras que la producción en el sector estatal es casi

inexistente, de manera que una política agrícola inteligente y audaz, basada en la combinación de métodos tradicionales con técnicas modernas, puede detener el deterioro del género *Dioscorea*. En este sentido, la introducción de la micropropagación *in vitro* aplicada con éxito en diversos clones procedentes de distintas especies de este género puede ofrecer una respuesta rápida.

La expresión cultivo *in vitro* de plantas significa cultivar fragmentos de plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivo tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes), y el control de los factores que afectan el crecimiento. La micropropagación o propagación clonal es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*; a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de la planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas (Castillo, 2008).

En la actualidad, en la región oriental de Cuba, uno de los genotipos de mayor importancia económica y comercial corresponde a *D. alata* L. clon caraqueño (Borges *et al.*, 2007) por lo que se hace necesario su inmediata recuperación mediante el perfeccionamiento de la metodología de micropropagación de esta especie (De la Cruz *et al.*, 1998; Medero *et al.*,

1999), principalmente en lo referido a las distintas técnicas de desinfección que permitan lograr mayores índices de establecimiento del material vegetal en condiciones *in vitro*. Dentro de las sustancias utilizadas en la desinfección del material vegetal se encuentran el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), etanol (C₂H₅OH) y bicloruro de mercurio (HgCl₂), donde el hipoclorito de sodio ha sido el compuesto más frecuentemente usado por varios investigadores con buenos resultados para la desinfección y el establecimiento *in vitro* del material vegetal, a concentraciones y tiempos diferentes. Este producto es efectivo, económico y de fácil adquisición. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de diferentes concentraciones y tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio sobre el establecimiento *in vitro* de ñame (*D. alata* L.) clon caraqueño y viabilidad de las vitroplantas en condiciones *ex vitro*.

Materiales y métodos

Material vegetal. Se emplearon segmentos uninodales desprovistos de hojas con una longitud aproximada de 20 mm, obtenidos de plantas donantes de ñame (*D. alata* L.) clon caraqueño cultivadas durante 35 días en condiciones semicontroladas (temperatura de 33 ± 2 °C, humedad relativa del 70-80%, e iluminación natural con fotoperiodo de 12 horas).

Tratamientos de desinfección. Se utilizaron 150 segmentos uninodales por tratamiento los cuales se lavaron con detergente comercial al 1% durante 30 min, luego se enjuagaron tres veces con abundante agua. Seguidamente, y dentro de la cabina de flujo laminar, se sumergieron 1 min en alcohol al 70%, después se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril, y finalmente se sumergieron en distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión según las siguientes variantes de desinfección:

Tratamientos	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de inmersión (min)
1	1,5	10
2	1,5	20
3	1,5	30
4	2	10
5	2	20
6	2	30
7(control)	2,5	10
8	2,5	20
9	2,5	30

Posteriormente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

Medio de cultivo. Estuvo compuesto por las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), 20 mg.l⁻¹ cisteína, 30 mg.l⁻¹ sacarosa y 7,5 mg.l⁻¹ agar como agente gelificante. Una vez preparado el medio de cultivo el pH de los medios se ajustó a 5,8; luego se fundió durante 10 min en horno microondas, se enfrió hasta 50 °C y se distribuyó en tubos de ensayo de 24 x 150 mm, a razón de 5 ml por tubo. Finalmente, se esterilizó en autoclave durante 25 min a 1 atmósfera de presión y 121 °C de temperatura.

Siembra de los explantes y condiciones de cultivo. Los segmentos nodales se cortaron a una longitud de aproximadamente 12 mm y se colocaron obedeciendo a la polaridad de la planta a razón de un explante por tubo bajo cabina de flujo laminar en condiciones asépticas. Finalmente, se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de 25 ± 1 °C, humedad relativa del 70-80%, e iluminación natural con un fotoperiodo de 14 horas.

Evaluación. A los siete días se tomaron aleatoriamente 100 explantes por cada tratamiento a los cuales se les determinaron el porcentaje de contaminación, necrosis y establecimiento (explantes en buen estado de crecimiento que no se contaminaron ni se necrosaron).

A los 40 días se tomaron aleatoriamente 40 explantes por cada tratamiento a los cuales se les determinaron las siguientes variables:

- Número de nudos de novo por explante.
- Longitud del vástago (medición con una regla graduada desde la base del explante hasta el ápice de la hoja más joven).
- Número de hojas por explantes (número de hojas totalmente extendidas).

A los 40 días se tomaron aleatoriamente 70 vitroplantas del mejor tratamiento (1,5% de

Donde:

% X	CE _x
Porcentaje de establecimiento	Número de explantes establecidos
Porcentaje de necrosis	Número de explantes necrosados o muertos
Porcentaje de contaminación	Número de explantes contaminados
Porcentaje de viabilidad <i>ex vitro</i>	Número de vitroplantas vivas en condiciones <i>ex vitro</i>

X: indicador biológico por evaluar; CE_x: cantidad de explantes con el indicador x; TE: cantidad total de explantes.

Diseño y análisis estadístico. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con análisis de varianza bifactorial (para determinar la influencia de las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos sobre el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de ñame (*D. alata* L.), clon caraqueño y varianza simple (para evaluar el porcentaje de viabilidad de las vitroplantas del mejor tratamiento en condiciones *ex vitro*) con tres repeticiones por tratamiento. Para la comparación de las medias de los distintos tratamientos se utilizó la prueba de Tukey. Todos los análisis estadísticos se procesaron con el paquete Statistica para Windows, versión 8 (StatSoft, 2008).

Resultados y discusión

Porcentaje de explantes establecidos, contaminados y necrosados

El efecto de los distintos métodos de desinfección con hipoclorito de sodio al 1,5; 2

hipoclorito de sodio durante 30 min) y control (tratamiento 7), las cuales se transfirieron a condiciones *ex vitro* sobre un sustrato compuesto por cachaza + suelo pardo con carbonato (1:1) contenido en bandejas de poliespuma (68 cm largo × 47 cm de ancho, con 70 pocillos de capacidad). A los 45 días de establecidas las vitroplantas en condiciones *ex vitro* (fase de aclimatización) se determinó el porcentaje de supervivencia.

El porcentaje se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% X = \frac{CE_x * 100}{TE}$$

y 2,5% durante 10, 20 y 30 min de inmersión sobre el *porcentaje de explantes establecidos, contaminados y necrosados* durante el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de ñame (*D. alata* L.) clon caraqueño, se muestra en la tabla 1. Se aprecia que los mayores valores para el porcentaje de establecimiento corresponden al tratamiento 3 (1,5% de hipoclorito de sodio durante 30 min), los cuales difieren significativamente del resto de los tratamientos evaluados para $p < 0,05$, incluyendo el control. También se puede observar que a medida que aumentan la concentración y el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio disminuyen el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento a partir del tratamiento 4, y se incrementa el porcentaje de necrosis o muerte de los explantes primarios cultivados en condiciones *in vitro*. Esto último se debe al efecto fitotóxico que produce el hipoclorito de sodio sobre los segmentos uninodales de ñame lo cual se hace más intenso a partir de la concentración de 2%. Esto coincide con lo señalado por Ramí-

rez *et al.* (2002) los cuales observaron un fuerte efecto fototóxico del hipoclorito de sodio a la concentración de 2% cuando se aplicó a la desinfección del material vegetal de diferentes cultivos como guayabo, ajonjolí y mora.

Los resultados del análisis de varianza bifactorial arrojaron un efecto significativo ($p < 0,05$) de la interacción entre las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio (1,5; 2 y 2,5%) y los tiempos de inmersión (10, 20 y 30 min) del material vegetal en las mismas sobre el porcentaje de explantes establecidos, contaminados y necrosados, lo que demuestra que efectivamente hay una influencia significativa de ambos factores en la desinfección de explantes primarios de ñame. A medida que aumentan la concentración de esta sustancia y el tiempo, disminuye el porcentaje de contaminación y se incrementa el de necrosis de los tejidos, alcanzándose un óptimo en el establecimiento *in vitro* de los explantes primarios de ñame mediante la desinfección con el tratamiento 3.

Los mejores resultados de la presente investigación (1,5% de hipoclorito de sodio durante 30 min de inmersión) difieren de los alcanzados por De la Cruz *et al.* (1998) durante la desinfección de segmentos uninodales de *D. alata* con 2,5% de hipoclorito de sodio durante 10 min los cuales alcanzaron un 28% de establecimiento *in vitro*, 12% de contaminación y 60% de necrosis.

Igualmente, estos resultados difieren de los obtenidos por varios autores durante la utilización de hipoclorito de sodio en la desinfección y el establecimiento *in vitro* de segmentos uninodales de ñame los cuales determinaron como concentraciones más adecuadas las siguientes: 1% durante 10 min en *Dioscoreas sp.* (Quintero *et al.*, 2003); 2% durante 20 y 10 min en *D. rotundata* (Mbanaso *et al.*, 2007); 1% durante 10 min (Royero *et al.*, 2007); 2% durante 10 min (Salazar y Hoyos, 2007), y 2,5% durante 10 min (Rodríguez *et al.*, 2008) en *D. alata*. Tampoco coinciden con los obtenidos por otros

Tabla 1. Influencia de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión sobre el porcentaje de explantes establecidos, contaminados y necrosados durante el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de ñame (*D. alata* L.) clon caraqueño.

T	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de inmersión (min)	Establecimiento (%)	Contaminación (%)	Necrosis (%)
1	1,5	10	50 b	47 a	3 c
2	1,5	20	60 b	37 a	3 c
3	1,5	30	91 a	5 b	4 c
4	2	10	36 c	5 b	59 b
5	2	20	34 c	4 b	62 b
6	2	30	31 c	4 b	65 b
7	2,5	10	30 cd	4 b	66 b
8	2,5	20	20 d	3 b	76 a
9	2,5	30	20 d	3 b	77 a
EE			1,59	2,3	3,48

Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0,05$ según prueba de Tukey. T, Tratamientos; EE, error estándar.

autores en el establecimiento de segmentos nodales *in vitro* de otras especies herbáceas mediante el uso de hipoclorito de sodio: 2% durante 20 min en la propagación *in vitro* de *Achyrocline satureioides* (Lam) (Gattuso *et al.*, 2007), y 0,8% durante 15 min en la multiplicación *in vitro* de la *Artemisia absinthium* L. (Le *et al.*, 2007).

También se pudo observar que la mayor parte de los contaminantes detectados correspondieron a hongos filamentosos y bacterias. Esto corrobora lo señalado por Folgueras *et al.* (2001), Das y Pal. (2005) y Rodríguez *et al.* (2008) que indican que los contaminantes más comunes durante el establecimiento *in vitro* de explantes procedentes de plantas adultas son los hongos y las bacterias que habitan de manera normal en el cultivo de las mismas en condiciones naturales.

Número de nudos de novo, longitud del vástago y número de hojas

En la tabla 2 se presenta la influencia de los distintos tratamientos de desinfección con

hipoclorito de sodio al 1,5; 2 y 2,5% durante 10, 20 y 30 min de inmersión en cada una de las concentraciones evaluadas sobre el número de nudos de novo y la longitud del vástago durante el establecimiento en condiciones *in vitro* de explantes primarios de ñame, donde se puede notar que no existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos.

Estos resultados son similares a los alcanzados por Ortiz (2008) durante la evaluación del establecimiento *in vitro* de explantes primarios de ñame (*D. alata* L.) clon caraqueño procedentes de plantas donantes establecidas en macetas sobre un sustrato compuesto por zeolita al 100% y diferentes mezclas de zeolita con estiércol vacuno donde alcanzó valores promedios de 2,3 y 1,8 para el número de nudos y la longitud del vástago respectivamente. Sin embargo, no concuerdan con los alcanzados por De la Cruz *et al.* (1998) y Medero *et al.* (1999) en la micropropagación de germoplasma de ñame (*D. alata* L.), y Borges *et al.* (2007) durante el estudio de la influencia de diferentes formulacio-

Tabla 2. Efecto de distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión sobre el número de nudos de novo, longitud del vástago y número de hojas durante el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de ñame (*D. alata* L.) clon caraqueño

T	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de inmersión (min)	Número de nudos de novo	Longitud del vástago (cm)	Número de hojas
1	1,5	10	2,38	1,92	3,08 ^a
2	1,5	20	2,28	1,63	2,60 ^a
3	1,5	30	2,3	1,70	2,73 ^a
4	2	10	2,23	1,72	2,1b
5	2	20	2,23	1,59	2,13b
6	2	30	2,33	1,76	2,33b
7	2,5	10	2,23	1,79	2,28b
8	2,5	20	2,18	1,68	2,23b
9	2,5	30	2,18	1,71	2,38b
EE			0,027	0,025	0,040

Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0,05$ según prueba de Tukey. T, Tratamientos; EE, error estándar.

nes de vitaminas en el medio de multiplicación *in vitro* de *D. alata* L. clon caraqueño donde obtuvieron resultados promedios para el número de nudos de novo y la longitud del vástago superiores a 2,5 y 2,2 cm respectivamente, a los 35 días de cultivo de las vitroplantas a partir de segmentos uninodales.

La evaluación de los distintos tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio al 1,5; 2 y 2,5% durante 10, 20 y 30 min de inmersión en cada una de las concentraciones evaluadas sobre el número de hojas (tabla 2) durante el establecimiento *in vitro* de ñame clon caraqueño, mostró un efecto significativo ($p \leq 0,05$) para este parámetro de crecimiento y desarrollo, donde los mayores valores corresponden a la concentración de hipoclorito de sodio 1,5% en los distintos tiempos de inmersión evaluados (tratamientos 1, 2 y 3) los cuales difieren significativamente del resto de los tratamientos.

El análisis de varianza bifactorial arrojó un efecto significativo ($p < 0,05$) de la interacción entre las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio (1,5; 2 y 2,5%) y los tiempos de inmersión (10, 20 y 30 min) del material vegetal en las mismas sobre el número de hojas, lo que demuestra que ciertamente hay una influencia significativa de ambos factores en el proceso de formación de hojas completamente extendidas durante el crecimiento *in vitro* de los explantes primarios de ñame hasta 40 días posteriores a la desinfección de los mismos, donde a medida que aumentan la concentración y el tiempo a

partir de 1,5% de hipoclorito de sodio, disminuye la formación de hojas totalmente extendidas.

Estos resultados evidencian que el crecimiento y desarrollo continuo de formación de nuevas hojas disminuye de forma significativa a medida que se incrementa la concentración de hipoclorito de sodio en sus distintos tiempos, a partir de 2%. Esto puede ser debido a que bajo estas condiciones los explantes sufren un mayor daño fitotóxico en sus tejidos lo que limita la regeneración *in vitro* de sus tejidos foliares. En este sentido, Borges *et al.* (2003) señalaron que durante la propagación *in vitro* del ñame se presenta un crecimiento y desarrollo vegetativo continuo de las hojas expresado en la formación de nuevas hojas y yemas producto de una importante actividad de crecimiento y diferenciación desplegada por los tejidos meristemáticos de las vitroplantas en relación con el contenido nutritivo del medio de cultivo, y que el proceso de formación de hojas proviene de divisiones celulares sucesivas en el seno de los tejidos meristemáticos, seguido de la expansión de las células y su diferenciación de las hojas.

Porcentaje de supervivencia de las vitroplantas en condiciones *ex vitro*

Los resultados de la viabilidad de las vitroplantas de ñame (*D. alata* L.) clon caraqueño procedentes del mejor tratamiento (1,5% de hipoclorito de sodio durante 30 min) en condiciones *ex vitro* arrojaron altos porcentajes de

Tabla 3. Porcentaje de supervivencia de las vitroplantas de ñame (*D. alata* L.) clon caraqueño procedentes del mejor tratamiento de desinfección en condiciones *ex vitro*

Tratamientos	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de inmersión (min)	Supervivencia (%)
3	1,5	30	95,7
7	2,5	10	94,3
EE			2,7

3 (mejor tratamiento de desinfección) y 7 (tratamiento control). EE, error estándar.

supervivencia (tabla 3) sin diferencias significativas con el tratamiento control.

Estos resultados son similares a los alcanzados por Aguilera *et al.* (1999) y Medero *et al.* (1999) en la aclimatización de vitroplantas de ñame *D. alata*, los cuales consideraron como resultados muy buenos en esta fase la supervivencia de las plantas a partir del 95%.

Chacon *et al.* (2005), al evaluar la aclimatización de plántulas de Yampi (*D. trifida*) y ñame (*D. alata*) producidas *in vitro* plantearon que lo más esencial en la aclimatización es garantizar que las plantas que se extraen del ambiente controlado no mueran, es decir, alcanzar altos porcentajes de supervivencia debido a que esta fase es trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de la misma dependerá en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso; sin duda es la fase más importante en la micropropagación.

Los resultados de esta investigación no coinciden con los obtenidos por Royero *et al.* (2007) al estudiar la micropropagación y organogénesis de *D. alata*, los cuales alcanzaron un 70,7% de supervivencia de las plántulas sobre un sustrato compuesto por tierra negra abonada:arena de río (1:1), y un 11,9% cuando fueron transferidos sobre un suelo con tierra negra solamente.

Conclusiones

La utilización de 1,5% de hipoclorito de sodio durante 30 min para la desinfección de explantes primarios de ñame (*D. alata* L.) clon caraqueño permitió establecer de manera exitosa en condiciones *in vitro* los segmentos unnodales desinfectados con altos porcentajes de establecimiento y supervivencia de las vitroplantas en condiciones *ex vitro*. También se demostró que la inmersión de los explantes en 1,5% de hipoclorito de sodio durante 10, 20 y 30 min tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento y desarrollo de las hojas de las vitroplantas.

Referencias bibliográficas

- Aguilera, N., Guedes, L., Borges, M. 1999. Aclimatización de clones de ñame (*Dioscorea alata* L.). En: *Libro de reportes cortos*. V coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas. Cuba: IBP, UCLV, pp. 12-15.
- Borges, M., Meneses, S., Vázquez, J., García, M. 2003. Conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata* L. por crecimiento mínimo. *Plant Genetic Resources Newsletter* 133: 8-12.
- Borges, M., Pérez, Y.; Zayas, D. 2007. Efecto de diferentes formulaciones de vitaminas en la multiplicación *in vitro* del ñame clon caraqueño. *Revista de Biotecnología Vegetal* 3 (3): 160-168.
- Chacón, A. G., Gómez, L., Torres, S., Saborío, F. 2005. Aclimatización de plántulas de Yampi (*Dioscorea trifida*) y ñame (*D. alata*) producidas *in vitro*. *Agronomía Costarricense* 29 (3): 47-58.
- Das, M., Pal, A. 2005. *In vitro* regeneration of *Bambusa balcoxa* Roxb. Factors affecting changes of morphogenetic competence in axillary buds. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81 (1): 109-112.
- De la Cruz, G., Borges, M., Aguilera, N., Saborit, G., Labrada, M. 1998. Multiplicación acelerada del ñame (*Dioscorea alata* L.) en condiciones *in vitro*. Resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, La Habana, Cuba, p. 8.
- Castillo, A. 2008. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA, 8 p.
- Folgueras, M., Herrera, L., Carrazana, D. 2001. La contaminación microbiana en la micropropagación *in vitro* de las raíces y tubérculos tropicales. En: *Libro de reportes cortos*. Ciego de Ávila: Taller internacional BioVeg' 2001, pp. 183-185.
- Gattuso, S., Scandizzi, A., Busilacchi, H., Di Sapio, O., Severin, C. 2007. Propagación *in vitro* a partir de segmentos nodales de *Achyrocline satureioides*. *Revista Facultad de Ciencias Agrarias, UNR XI, Argentina*, 4 p.
- Lé, CL., Julmi, C., Tschuy, F. 2007. Multiplication *in vitro* de l'absinthe (*Artemisia absinthium*). *Revue suisse Vitic Arboric Hortie* 39 (4): 263-267.
- Mbanaso, ENA., Chukwu, LI., Opara, MUA. 2007. *In vitro* basal and nodal microtuberization in yam shoot cultures (*Dioscorea rotundata* poir, cv Obiaoturugo) under nutritional stress conditions. *African Journal of Biotechnology*, 6 (21): 2444-2446.

- Medero, V., Del sol, L., García, M., López, J., Ventura, C., Rodríguez, S. 1999. Metodología para la micropropagación del ñame (*Dioscorea alata* L.). Resúmenes BIOCAT-99, Granma, Cuba, p. 12.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Ortiz, Y. 2008. Influencia de diferentes mezclas de zeolita-materia orgánica en el crecimiento, desarrollo y sanidad de plantas donantes de ñame (*Dioscorea alata* L.) clon caraqueño en condiciones de macetas para el cultivo *in vitro*. Trabajo de Diploma. Universidad de Granma. Granma, Cuba, 50 p.
- Quintero, I., Polo, J., Jarra, A., Espitia, A. 2003. Enraizamiento *in vitro* de *Dioscoreas* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5 (2): 51-56.
- Ramírez, M., Urdaneta, A., León de Sierralta, S. 2002. Establecimiento *in vitro* de explantes adultos del guanabo (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. *Rev Fac Agron* 19 (1): 1-8.
- Rodríguez, M., Matehus, J., Gersti, A., Santana, M. A. 2008. Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (*Dioscorea alata* L.). *Interciencia* 33 (7): 1-11.
- Royero, M., Vargas, T. E., Oropeza, M. 2007. Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* L. *Interciencia* 32 (4): 247-254.
- Salazar, R., Hoyos, R. A. 2007. Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistemas de inmersión temporal. *Rev Fac Nal Agr Medellín* 60 (2): 3907-3921.